UNIVERSITÀ DI PISA
ISTITUTO DI PATOLOGIA VEGETALE
E DI MICROBIOLOGIA AGRARIA E TECNICA
OSSERVATORIO REGIONALE DI FITOPATOLOGIA

287

O. VERONA e M. AGELLI

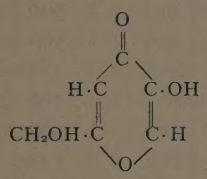
Qualche ricerca sull'azione antibiotica dell'acido cogico

Dai « Rendiconti dell'Accademia Nazionale dei Lincei »
(Classe di Scienze fisiche, matematiche e naturali)
serie VIII, vol. XIV, fasc. 5 – maggio 1953

Microbiologia. — *Qualche ricerca sull'azione antibiotica dell'acido cogico* (*). Nota di ONORATO VERONA e MARIO AGELLI, presentata (**) dal Socio A. CHIARUGI.

L'acido cogico fu rinvenuto la prima volta da Saito nel 1907 tra i prodotti di fermentazione, dovuta ad *Aspergillus oryzae*, di decotto di riso [1].

Il nome gli fu dato più tardi da Yabuta [2] che ne studiò anche la composizione chimica [3]. Risultò trattarsi del 5–idrossi–2–idsossimetil–y–pirone:



In seguito fu visto che l'acido cogico può essere prodotto oltre che da *Asp. oryzae* anche da numerosi altri funghi nonché, in condizioni favorevoli, da molte specie di Acetobatteri.

Per quanto è oggi noto le specie microbiche capaci di produrre acido cogico sono:

Acetobacter spp. [4]
Aspergillus sp. [8]
» *albus* [4, 6]
» *alliaceus* [7]
» *awamori* [4]
» *candidus* [4, 6]
» *clavatus* [4]
» *effusus* [4, 6]
» *flavus* [4, 6]
» *fumigatus* [4]
» *giganteus* [4]
Aspergillus glaucus [4, 9]
» *gymnosardae* [4]
» *luteo–virescens* [5]
» *nidulans* [4, 6]
» *oryzae* [4, 6]
» *parasiticus* [4, 6]
» *tamarii* [4, 6]
» *wentii* [7]
Penicillium chrysogenum [5]
» *dalae* [4, 6]

(*) Dall'Istituto di Patologia vegetale e Microbiologia agraria dell'Università di Pisa.
(**) Nella seduta del 9 maggio 1953.

Da tempo è noto che l'acido cogico esercita una qualche azione antibatterica, peraltro molto limitata qualora, forse, si faccia eccezione per alcune specie di *Leptospira*. Queste infatti vengono inibite nello sviluppo alle concentrazioni di 1/100.000–1.000.000, mentre la maggior parte degli altri germi è sensibile solo a concentrazioi i ben più elevate (1/500–1/2.000). È il caso di sottolineare che questa pur debole attività antibiotica si ha verso germi sia gramnegativi sia grampositivi e che non è inibita da siero [10, 6].

Nulla è noto, tuttavia (come risulta dall'allegato spettro), quale sia l'azione esercitata dall'acido cogico sui lieviti e sui funghi, massime sui funghi fitopatogeni. Ond'è che abbiamo ritenuto opportuno dar corso a qualche ricerca in tal senso pur non tralasciando di indagare, preliminarmente, l'azione antibatterica con riferimento, tra l'altro, ad *Agrobacterium tumefaciens*, noto batterio fitopatogeno.

SPETTRO DELL'ACIDO COGICO.

	conc. inibente
Aërobacter aërogenes	1 : 500–1 : 1.000 [5]
Alcaligenes fecalis	1 : 500 [5]
Bacillus anthracis	1 : 500–1 : 1.000 [5]
Bac. megaterium	1 : 1.000 [5]
Bac. mesentericus	1 : 500 (parziale) [5]
Bac. mycoides	1 : 500–1 : 400 [5, 11]
Bac. novus	1 : 1.000 [5]
Bac. subtilis	1 : 500 (parz.)–1 : 1.700 [5, 11]
Brucella abortus	1 : 4.000 [5]
» *melitensis*	1 : 2.000 [5]
» *suis*	1 : 4.000 [5]
Chromobact. indicum	1 : 500 [5]
» *violaceum*	1 : 2.000 [5]
Clostridium botulinum	1 : 500 (parziale) [5]
» *histoliticum*	no inibizione a 1 : 500 [5]
» *novyi*	1 : 500 [5]
» *perfringens*	no inibizione a 1 : 500 [5]
» *sporogenes*	no inibizione a 1 : 500 [5]
» *tetani*	no inibizione a 1 : 500 [5]
Corynebact. diphtheriae	no inibizione a 1 : 500 [5]
» *xerosis*	1 : 500 (parziale) [5]
Diplococcus pneumoniae	1 : 500–1 : 2.000 [5]
Escherichia sp.	1 : 400–1 : 800 ; 1 : 2.000 [6, 5]
Gaffkya tetragena	1 : 500–1 : 1.000 [5]
Klebsiella pneumoniae	1 : 500–1 : 1.000 [5]
Leptospira canicola	1 : 1.000.000 [5]
» *icterohemorrhagiae*	1 : 100.000 [5]

	conc. inibente
Micrococcus aurantiacus	1 : 500 (parziale) [5]
» *roseus*	1 : 500 [5]
Mycobacterium phlei	1 : 4.000 [11]
» *smegma*	1 : 3.300 [11]
Neisseria catarrhalis	1 : 2.000–1 : 4.000 [5]
» *gonorrhoeae*	no inibizione a 1 : 2.000 [5]
» *intracellularis*	no inibizione a 1 : 2.000 [5]
» *perflava*	no inibizione a 1 : 2.000 [5]
» *sicca*	no inibizione a 1 : 2.000 [5]
Pasteurella avicida	no inibizione a 1 : 4.000 [5]
» *boviseptica*	no inibizione a 1 : 4.000 [5]
» *caviae*	no inibizione a 1 : 4.000 [5]
» *equiseptica*	no inibizione a 1 : 4.000 [5]
» *oviseptica*	no inibizione a 1 : 4.000
» *pestis*	1 : 4.000 [5]
Photobacterium fischeri	1 : 4.000 [11]
Proteus sp.	1 : 400–1 : 800 [11]
» *mirabilis*	1 : 500 [5]
» *vulgaris*	1 : 500 [5]
Pseudomonas aeruginosa	1 : 500 [5]
» *fluorescens*	1 : 2.000 [5]
Salmonella aertrycke	1 : 1.000 [5]
» *cholerae-suis*	1 : 500 [5]
» *enteritidis*	1 : 400–1 : 800 ; 1 : 500 [6 , 5]
» *parathyphi*	1 : 500–1 : 1.000 [5]
» *pullorum*	1 : 1.000 [5]
» *schottmnelleri*	1 : 500 [5]
» *typhi*	1 : 500–1 : 1.000 [5]
Sarcina lutea	1 : 1.000 [5]
Serratia marcescens	1 : 500 [5]
Shigella dysenteriae	1 : 500–1 : 2.000 [5]
» *paradysenteriae*	1 : 500 [5]
Spirillum rubrum	1 : 1.000 [5]
Staphylococcus albus	1 : 500 (parziale) [5]
» *aureus*	1 : 800–1 : 1.600 ; 1 : 500 [6 , 5]
» *citreus*	1 : 500 (parziale) [5]
Streptococcus fecalis	no inibizione a 1 : 500 [5]
Vibrio comma	1 : 2.000 [5]
» *metchnikovii*	1 : 2.000 [5]
» *proteus*	1 : 4.000 [5]
» *schuykilliensis*	1 : 2000 [5]

1. AZIONE DELL'ACIDO COGICO SU DI ALCUNI SCHIZOMICETI. – Lo spettro che abbiamo riportato comprende già così tante specie per cui le poche

ricerche eseguite non hanno che valore complementare. Come prima ricerca fu saggiato il comportamento di *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Bac. subtilis*, *Bac. vulgatus*, *Bac. mesentericus* in brodo nutritivo assente o presente acido cogico [1] aggiunto al mezzo in quantità seriate entro i limiti dello 0.1–1 %. Al 10° giorno di coltura si ebbe:

	acido cogico %						
	—	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1.–
Agrobact. tumefaciens	+	+	+	+·	—	—	—
Bac. mesentericus	+	+	+·+	—	—	—	—
Bac. subtilis	+	+	+·+	—	—	—	—
Bac. vulgatus	+	+	+·+	—	—	—	—
Escherichia coli	+	—	—	—	—	—	—
Staphyloc. aureus	+	+	+	+	+·	—	—

(· sviluppo assai scarso; + sviluppo ritardato)

All'osservazione microscopica nelle colture di Stafilococco fu notato, nelle più alte concentrazioni, cellule meno rotonde, forse un po' più grosse, meno tingibili. Nelle colture di *Agrobact. tumefaciens* qualche anomalia morfologica fu anche accompagnata da minore tingibilità. In *Bac. subtilis*, appena notando come in presenza dello 0.2 % del composto lo sviluppo non fosse accompagnato da velo, fu osservato che le cellule, invece di essere disposte, come lo sono normalmente, in fili o ammassi, si presentavano per la massima parte isolate.

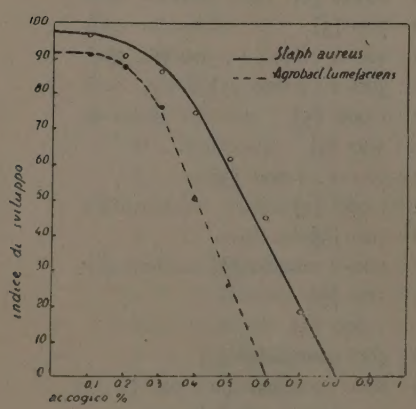


Fig. 1. – Sviluppo di *Staph. aureus* e *Agrobact. tumefaciens* in presenza di quantità crescenti di acido cogico.

Di seguito si è voluto meglio apprezzare lo sviluppo di *Staphyloc. aureus* e di *Agrobact. tumefaciens* attraverso l'intensità di intorbidamento del liquido colturale, apprezzata a mezzo di colorimetro a cella fotoelettrica. Fu ottenuto:

(1) L'acido cogico usato ci fu fornito dalla L. Light e Co., Ltd. di Colnbrook (Inghilterra).

acido cogico	% di luce assorbita	
%	Stafilococco	Agr. tumefac.
—	98	93
0.1	96	92
0.2	90	87
0.3	86	75
0.4	74	50
0.5	61	24
0.6	45	—
0.7	18	—
0.8	—	—

Nel confermare, per *Staphyloc. aureus*, *Escherichia coli* e *Bac. subtilis*; e nel rilevare, per *Agrobact. tumefaciens*, questa debole azione antibiotica dell'acido cogico non abbiamo escluso, in analogia ad altri casi, un'influenza della carica d'inoculum. Epperò si sono allestite altre prove, limitatamente allo Stafilococco, *Agrobact. tumefaciens*, *Bac. subtilis*, consistenti nel seguire lo sviluppo di queste specie in colture inficiate con masse diverse di inoculo.

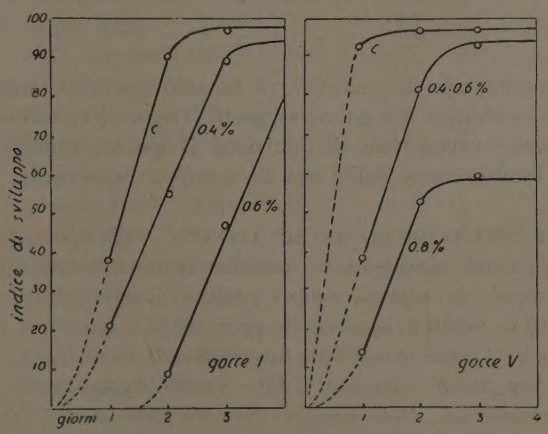


Fig. 2. – Sviluppo di *St. aureus* in rapporto alla concentrazione nel mezzo di ac. cogico e alla massa d'inoculo.

Questo era rappresentato da gocce I–II–III–IV–V di una sospensione omogenea in acqua distillata sterile di germi provenienti da colture in agar di 48 h. Lo sviluppo fu apprezzato macroscopicamente indicando con 0.5–1 quello più scarso e con 5 quello massimo; per alcune colture (che allo scopo ripetemmo) lo stesso sviluppo si volle apprezzare con più esattezza per mezzo dell'indice dell'intorbidamento.

Sviluppo di *St. aureus*, *Agrobact. tumefaciens*, *Bac. subtilis* in brodo inficiato con cariche diverse di inoculo (gocce I–V).

	inoculo:																			
		gocce I				gocce II				gocce III				gocce IV				gocce V			
dopo giorni:		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Staph. aureus																					
ac. cogico %	—	3	4	5	5	4	5	5	5	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
»	0.1	3	4	5	5	4	5	5	5	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
»	0.2	2	3	4	5	3	4	5	5	3	5	5	5	3	5	5	5	4	5	5	5
»	0.4	2	3	4	5	3	3	5	5	3	4	5	5	3	5	5	5	3	5	5	5
»	0.6	–	2	3	4	1	3	4	5	2	4	5	5	2	5	5	5	2	5	5	5
»	0.8	–	–	–	–	–	–	0.5	1	0.5	1	2	3	1	2	3	3	2	3	3	3
»	1.–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.5
Agrob. tumefaciens																					
ac. cogico %	—				5				5				5				5				5
»	0.1				4				5				5				5				5
»	0.2				3				3				5				5				5
»	0.4				2				3				4				5				5
»	0.6				–				–				–				2				2
»	0.8				–				–				–				–				–
Bac. subtilis																					
ac. cogico %	—	3	5	5	5	4	5	5	5	4	5	5	5	4	5	5	5	5	5	5	5
»	0.1	1	4	5	5	2	5	5	5	3	5	5	5	4	5	5	5	4	5	5	5
»	0.2	0.5	1	1	1	1	1	2	2	2	2	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3
»	0.4	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1	2	2	2
»	0.6	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

Così si osserva che la quantità di inoculo manifesta non trascurabile influenza sullo sviluppo dei germi saggiati. Tanto che qualora l'inoculo sia massivo la stessa percentuale di inibizione si sposta. Influenza si ha, poi, sulla fase di latenza come sulla fase di sviluppo logaritmico.

2. Azione dell'acido cogico sui lieviti. – L'acido cogico non manifesta, nelle quantità sperimentate, nessuna azione inibente sui lieviti. L'affermazione discende dai reperti, sempre positivi, avuti coltivando una serie rappresentativa di lieviti in agar–malto presente ac. cogico fino nelle quantità massime dell'1 %. Le specie coltivate furono: *Sacch. cerevisiae* var. *ellipsoideus* (Hansen) Dekker, *Sacch. chevalieri* Guill., *Sacch.* (*Zygosacch.*) *veronae* Lodder et v. Rij, *Hansenula* sp., *Debaryomyces tyrocola* Konokotina, *Rhodotorula* sp., *Candida albicans* (Robin) Berkh., *Candida pulcherrima* (Lidner) Windisch.

Altresì nessuna particolare influenza esercita l'acido cogico sull'andamento del processo fermentativo, sostenuto su mosto da *Sacch. ellipsoideus*, in quanto esso sia presente nella quantità dello 0.5 %.

In via complementare abbiamo quindi voluto controllare una affermazione di Traetta–Mosca il quale, pervenuto all'isolamento dell'acido cogico, trovò che esso è fermentato dal lievito di birra con formazione di an. carbonica ed alcool [9].

A questo scopo abbiamo seminato vari ceppi di lievito ellittico e di altre specie (*Sacch. veronae*, *Hansenula* sp., *Kloeckera apiculata*, *Candida pulcherrima*) in acqua di lievito addizionata dell'1 % di acido cogico conte-

nuta in tubi di Einhörn-Smith. Lo sviluppo fu sempre positivo ed altresì abbondante; ma, anche trascorso molto tempo, non fu mai notato sviluppo di an. carbonica. In più osservammo che l'acido cogico permane nei liquidi colturali, fatta eccezione per *Sacch. veronae* che sembra dunque metabolizzarlo pur senza formare, come si diceva, an. carbonica.

L'osservazione di Traetta-Mosca rimane quindi non confermata sì che vien fatto di pensare – attese le modalità sperimentali da lui seguite – che il registrato reperto positivo fosse dovuto a sviluppo di germi inquinanti il lievito di birra avendo egli usato come materiale d'inoculo lievito di birra del commercio anziché colture pure.

3. AZIONE DELL'ACIDO COGICO SUI FUNGHI A MICELIO. – Abbiamo saggiata una piccola serie di funghi a micelio, incluse specie fitopatogene, su agar-fagiuoli saccarosato contenente acido cogico nelle quantità seriate dello 0.1-0.3-0.5-1 %.

Incubato per molto tempo a 24-26° C fu osservato quanto segue:

	Sviluppo in presenza di ac. cogico (2)			
	0.1 %	0.3 %	0.5 %	1 %
1 *Alternaria porri* (Ell.) Saw. f. sp. *solani* (E. et M.) Neergaard	+	+	±	—
2 *Aspergillus niger* v. Tiegh.	+	+	+	+
3 » *oryzae* (Ahlb.) Cohn.	+	+	+	+
4 *Botrytis cinerea* Pers.	+	+	±	—
5 *Endothia parasitica* (Murr.)	±··	—	—	—
6 *Fus. avenaceum* (Fr.) Sacc.	+	+	+	+··
7 » *lini* Bolley	+	+	+	+·
8 » *solani* (Mart.) App. et Wr.	+	+	+	+
9 » *vasinfectum* Atk.	+	+	+	+·
10 *Pen. brevi-compactum* Dierckx	+	+	+	+
11 » *chrisogenum* Thom	+	+	+	+
12 » *citrinum* Thom	+	+	+	+
13 » *flavidorsum* Biourge	+	+	+	+
14 » *frequentans* Westl.	+	+	±	+
15 » *notatum* Westl.	+	+	+	+
16 » *roqueforti* Thom	+	+	+	+···
17 *Rosellinia necatrix* (Hart.) Berl.	+	+	+	+
18 *Sclerotium Rolfsii* Sacc.	+	+	+	±
19 *Sphaeropsis dalmatica* (Thüm) Gig.	+	+	+·	—
20 » *malorum* Pk.	+	+	+	+
21 *Stachybotris atra* Cda.	+	+	±	—
22 *Trichoderma* sp.	+	+	+	+
23 *Verticillium albo-atrum* R. et Berth.	+	±	—	—

(2) · sviluppo scarso; ·· sviluppo scarso e lento; ··· forte disturbo nella sporificazione.

L'azione antibiotica dell'acido cogico non appare dunque molto manifesta verso i funghi a micelio. In presenza dell'1 %, in dose cioè da ritenersi notevole, solo 6 specie, su 23 (cioè il 26 %), non hanno infatti sviluppato e solo 5 specie hanno dimostrato svilupparsi scarsamente. In presenza dello 0.5 % le specie incapaci di svilupparsi o di svilupparsi molto male sono scese rispettivamente a due e quattro. A concentrazioni inferiori tutte le specie saggiate si sono sviluppate fatto solo eccezione di *Endothia parasitica* che è risultata la specie più sensibile.

Questa tollerabilità, relativamente alta, presentata dai funghi a micelio verso l'acido cogico, ci ha fatto pensare che il composto potesse essere non solo tollerato, ma anche utilizzato come sorgente alimentare di carbonio. Ciò ci venne suggerito, tra l'altro, da una osservazione di Corbellini e Gregorini [12] che avevano notato come alcuni Aspergilli cogicogenetici appartenenti al gruppo di *Asp. flavus* distruggessero in un secondo tempo l'acido cogico formato.

Per accertare questa possibilità si sono allestite colture di *Asp. oryzae*, *Asp. niger*, *Pen. notatum*, *Botrytis cinerea* in mezzo Czapek–Dox contenente al posto dello zucchero acido cogico 0.25–0.5–1 %.

Incubato in termostato per circa un mese fu notato che solo l'*Aspergillus oryzae* si era sviluppato abbondantemente (fatta eccezione del controllo in cui mancava la sorgente di carbonio) anche in presenza dell'1 % di acido cogico. Il liquido nutritivo, in queste colture, dimostrò di non contenere più acido cogico risultando negativa la tipica reazione con il cloruro di ferro.

In realtà esistono dunque specie che non solo tollerano, ma anche metabolizzano l'acido cogico ed è probabile, che queste specie, siano quelle dotate di proprietà cogicogenetiche. La proprietà di formare e quindi di distruggere determinati composti si riscontra in molti microrganismi; e questo sta a significare che il metabolita che si considera rappresenta solo, in tali casi, il prodotto di una delle fasi intermedie di un processo a catena.

Bibliografia

[1] K. Saito, *Ueber die Säurebildung bei Aspergillus oryzae*. « Botan. Mag. Tokyo », vol. 21, p. 240 (1907).

[2] T. Yabuta, *On Kojic acid, a new organic acid formed by Aspergillus oryzae*. « Jour. Coll. Agr., Tokyo Imp. Univ. », vol. 5, p. 51 (1912).

[3] T. Yabuta, *The constitution of Kojic acid, a γ-pyrone derivative formed by Aspergillus oryzae from carbohydrates*. « Journ. Chem. Soc. (Japan) », vol. 125, p. 575 (1924).

[4] S. C. Prescott e C. G. Dunn, *Industrial microbiology*. N. Y., 1949.

[5] H. Morton, W. Kocholaty, R. Junowicz–Kocholaty e A. Kelner, *Toxicity and antibiotic activity of Kojic acid produced by Aspergillus luteo-virescens*. « Journ. Bact. », vol. 50, p. 579 (1945).

[6] M. A. Jennings e T. J. Williams, *Production of Kojic acid by Aspergillus effusus*. « Nuture », vol. 155, p. 302 (1945).

[7] D. Gill–Carey, *The nature of some antibiotics from Aspergilli*. « Brit. J. Exper. Path. », vol. 30, p. 119, 1949.

[8] J. L. YUILL, *Production of itaconic acid and Kojic acid by a species of Aspergillus*, « Nature », vol. 161, p. 397 (1948).

[9] F. TRAETTA-MOSCA, *La fermentazione di alcuni zuccheri, mediante l'Asp. glaucus con alcune considerazioni sulla fermentazione alcoolica*. « Ann. Chim. Appl. », vol. 1, p. 477 (1914).

[10] A. H. COOK e M. S. LACEY, *Kojic acid and the antibiotic action of species of Aspergillus*. « Nature », vol. 155, p. 790 (1945).

[11] F. KAVANAUGH, *Activities of twenty two antibacterial substances against nine species of bacteria*. « Journ. Bact. », vol. 54, p. 761 (1947).

[12] A. CORBELLINI e B. GREGORINI, *La formazione dell'acido cogico dagli idrati di carbonio per azione dell'Asp. flavus*. « Gazz. Chim. Ital. », vol. 60, p. 244 (1930).

Roma, 1953. — Dott. G. Bardi, Tipografo dell'Accademia Nazionale dei Lincei.